Dünnschichtchromatographische Untersuchungen über Metopiron und seine Metaboliten in Harn und Duodenalflüssigkeit

---

von

Fritzmartin Wink

aus Neusatz/Jugoslawien

1966

1967 № 245

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535725_0006

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Medizinischen Klinik
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. N. Henning)

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen über Metopiron und seine Metaboliten in Harn und Duodenalflüssigkeit

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Fritzmartin Wink
aus Neusatz/Jugoslawien

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof.Dr.med. K. G. Ober
Referent: Prof.Dr.med.N.Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 10. 1966

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
Einleitung	1
Methodik	2-6
Ergebnisse	7-10
Diskussion	11-12
Zusammenfassung	13
Abbildungen	14-19
Tabellen	20-21
Literaturverzeichnis	22-27

E I N L E I T U N G

Während über die klinische Anwendbarkeit von Metopiron zur Prüfung der endogenen ACTH-Mobilisierung durch 11-β Hydroxylasehemmung zahlreiche Mitteilungen vorliegen (Übersicht siehe 1-7, 9-27, 29, 30, 32, 33, 35), ist über die Metabolisierung dieser Substanz im menschlichen Organismus bisher nichts bekannt. Insbesondere wurde der Wirkungseintritt und die Wirkungsdauer des Metopiron bislang nur auf Grund bestimmter Effekte, z.B. auf den Steroid- oder Kohlehydratstoffwechsel ermittelt. So zeichnet sich nach unseren früheren Untersuchungen bereits innerhalb von 1 Stunde nach der i.v. Applikation von 1-2 g Metopiron ein gewisser Sekundäreffekt im Zuckerstoffwechsel, aber auch innerhalb anderer Stoffwechselzweige ab (36, 37). Die Beeinflussung des ACTH-Spiegels unter Metopiron wurde lediglich nach der oralen Anwendung dieser Substanz kontrolliert (28). Somit konnten auf Grund der bisherigen Untersuchungen nur sekundäre Angaben über die Pharmakodynamik des Metopiron gewonnen werden. Es tauchte daher die Frage auf, inwieweit Metopiron in verschiedenen Körperflüssigkeiten nachweisbar ist, wann das Eliminationsmaximum auftritt, wie lange es sich im Organismus findet und schließlich, ob Metaboliten in den einzelnen Körperflüssigkeiten zu finden sind. Außerdem blieb zu prüfen, ob die Elimination des Metopiron und seiner Stoffwechselmetaboliten in freier oder veresterter Form stattfindet, wobei gleichzeitig auch auf vermehrte Elimination körpereigener Substanzen zu achten war.
Zur Bearbeitung der vorliegenden Thematik kamen insbesonders qualitative, semiquantitative und präparative dünnschichtchromatographische Verfahren zur Anwendung, die sich uns bei ähnlichen Problemstellungen bereits früher bestens bewährt hatten (8, 31, 38, 39).

M E T H O D I K

Zur Bestimmung des Metopiron und insbesondere für seine Abtrennung von anderen Substanzen und schließlich zur Darstellung eventueller Metaboliten des 11-β Hydroxylase-blockers kam die Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Varianten zur Anwendung. Neben dem Originalverfahren nach Stahl (34) wurden auch präparative Trennungsverfahren mit 40 cm oder 60 cm Platten verwendet.

Färberischer Nachweis:

Nach Lösung des Metopiron in Methanol, Chloroform, Essigsäureäthylester, Aceton, CCl_4, Diäthyläther oder Wasser wurden über 100 verschiedene Farbreaktionen getestet, von denen sich folgende bewährt haben:

1. Für Mengen über 100 γ schwache Reaktion mit Pauly's Reagenz und Echtblausalz.
2. Durch Anfärbung mit nach folgendem Rezept hergestellten Jodreagenz war der Nachweis von Mengen bis zu 0,1 γ möglich:
Lösung 1: 8 g KJ + 4 g J_2 in 65 ml Äthanol + 10 ml H_2O gelöst.
Lösung 2: 38 %ige HCl + Äthanol im Verhältnis 2:3 gemischt.
Fertiges Reagenz: 1 Teil von Lösung (1) + 2 Teile von Lösung (2). Zur Färbung eignet sich am besten eine frisch angesetzte Mischung. Der beim Zusammengießen der beiden Teillösungen entstehende Niederschlag wird abfiltriert. Die Platten werden fein besprüht bis sie gleichmäßig leicht angefeuchtet sind und anschließend mit einem Föhn ebenso gleichmäßig getrocknet. Metopiron wird dabei rotbraun gefärbt. Ein zweites Besprühen bringt eine deutliche Vertiefung der Färbung. Die Farbreaktion ist nicht stabil.
3. Durch UV-Absorption (250 mμ) auf ZN-Super-Leuchtstoffplatten war Metopiron in Mengen bis zu 1 γ deutlich nachzuweisen.

Von den geprüften Steigmittelsystemen haben sich bei Verwendung von Reinsubstanz mehrere bewährt. Bei Bestimmungen aus Körperflüssigkeiten und zur Abtrennung von Metaboliten sind jedoch nur wenige geeignet (s.u.).

Extraktion aus Körperflüssigkeiten:

Mit Hilfe von vergleichbaren Bezugsmengen der Reinsubstanz wurden die Extraktionsverluste mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln aus Galle, Serum und Urin chromatographisch semiquantitativ festgestellt. Bei Mengen bis zu 100 Metopiron zeigte die Methode eine ausreichende Genauigkeit.
Die Ausarbeitung eines photometrischen oder fluorometrischen Verfahrens ist bisher nicht gelungen.
Bei diesen Zusatzversuchen wurden je 10 ml Harn mit der doppelten Menge Äther, Dichloräthan, Essigsäureäthylester, Chloroform und CCl_4 je 3 x 5 Minuten geschüttelt, die gewonnenen Extrakte bei 50° C und Unterdruck auf 1 ml eingeengt und semiquantitativ ausgewertet. Die Extraktionsverluste waren bei CCl_4 mit 30 % am größten, nahmen nach Anwendung von Diäthyläther und Dichloräthan wesentlich ab und betrugen bei Essigsäureäthylester und Chloroform nur noch 10 %. Berücksichtigt man außerdem die Reinheit der gewonnenen Chromatogramme, so erwiesen sich Dichloräthan und Chloroform als die günstigsten Extraktionsmittel.
Die gleichen Verluste bei Verwendung von Chloroform fanden sich auch nach Zusatz von Metopiron zum Serum, während sie nach Extraktion aus Galle mit 15 % gering höher lagen. Sofern eine erhebliche Emulsionsbildung zustande kam, hat sich für die Extraktion aus Galle auch Diäthyläther bewährt, allerdings stieg der Extraktionsverlust auf 25 % an.

Untersuchung der Stabilität von Metopironlösungen:

Um bei späteren Belastungsversuchen Verwechslungen von spon-

tan auftretenden Zersetzungsprodukten mit eventuell auftretenden Metaboliten zu vermeiden, wurde die Reinsubstanz auf ihre Stabilität in verschiedenen Lösungen und unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

1.) Stabilität einer Metopironlösung ohne Lichtabschluß:
10 mg Metopiron wurden in 10 ml Essigsäureäthylester gelöst und 4 Tage lang täglich chromatographisch auf ihre Reinheit überprüft. Vom 1. bis 3. Tag blieb die Reinsubstanz stabil. Es fand sich eine einheitliche Fraktion (Rf bei System Chloroform : Methanol = 9:1 0,76). Ab dem 4. Tag fanden sich 4 Fraktionen von annähernd gleicher Menge mit verschiedenen Eigenschaften und folgenden Steighöhen:

1. Fraktion: Auftragepunkt - Rf 0
2. Fraktion: 4 cm - Rf 0,26
3. Fraktion: 7,5 cm - Rf 0,5
4. Fraktion: 11,5 cm - Rf 0,75 = Metopiron-Reinsubstanz.

Alle Fraktionen waren durch UV-Absorption nachzuweisen. Neben der Reinsubstanz war jedoch nur die Fraktion mit Rf 0,5 mit dem Jodreagenz anfärbbar.

2.) Stabilität von Metopironlösungen in Galle, Magensaft, Serum und Urin: Je 100 ml eines Urins und einer Magensaftsammelportion, je 20 ml einer Galle- und Serumsammelportion wurden 100 mg Metopiron zugesetzt und bei 37o C 1, bzw. 4 Tage lang im Brutschrank aufbewahrt. Ebenso wurde mit zuvor aus den verschiedenen Körpersäften abgetrennten Portionen zur vergleichenden Leerwertbestimmung verfahren.
Nach 1 Tag war keine, nach 4 Tagen eine äußerst schwache Abspaltung einer Fraktion, die dem Autoxidationsprodukt mit Rf-Wert 0,5 entsprach, zu finden.
Entsprechende Kontrollen der in Ampullen gelieferten Charge ergaben keinen Anhalt für das Auftreten neuer Fraktionen.

Belastungsversuche:

Für die Untersuchung der Ausscheidung im Harn erhielten 7 gesunde Versuchspersonen je 1 g Metopiron i.v. appliziert. Der nach Belastung ausgeschiedene Urin wurde zunächst stündlich, später in 2-8 Stundenportionen bis zu 36 Stunden gesammelt. 10 ml der jeweiligen Harnmenge wurden mit Chloroform und Dichloräthan entsprechend der oben beschriebenen Methode extrahiert. Von den auf 1 ml eingeengten Extrakten wurden verschiedene Mengen aufgetragen (meist genügte 0,1 ml) und mit Chloroform : Methanol = 9:1 als Steigmittel aufgetrennt.
Zur Prüfung, inwieweit eine bessere Extraktion der auftretenden Metaboliten mit anderen Lösungsmitteln zu erreichen ist, wurden je 10 ml einer bis zu 2 Stunden nach Metopironbelastung gesammelten Harnmenge und zum Vergleich eine entsprechende Leerwertmenge mit Chloroform, CCl_4, Dichloräthan und Essigsäureäthylester extrahiert. Die gefundenen Metaboliten wurden isoliert und nach Prüfung ihrer chromatographischen Reinheit wurde versucht, sie mit Hilfe der IR-Spektralanalyse zu identifizieren. Die qualitative Auswertung erfolgte sowohl unter UV-Licht als auch durch Färbung mit dem Jodreagenz, die quantitative Auswertung wie beschrieben unter UV-Licht. Als Bezugssubstanz wurde sowohl für Metopiron als auch für die Metaboliten eine Metopiron-Reinsubstanzmaßlösung herangezogen.
Für die Untersuchung der Ausscheidung in der Galle, die mit der Duodenalsonde gewonnen wurde, erhielten 6 Personen eines nicht ausgesuchten Kollektivs (Patienten mit Leber-Ca, Hepatitis, Colitis und gesunde Versuchspersonen) je 1 g Metopiron i.v. appliziert, nachdem zunächst 20 - 30 ml Galle gesammelt worden waren. Anschließend wurde die Galle in Fraktionen bis zu 2 Stunden gesammelt. In 3 Fällen gelang es die Proben mit Chloroform nach der Harnextraktionsmethode zu extrahieren und aufzutrennen. In den übrigen 3

Fällen wurde mit je 50 ml Diäthyläther 3 x 5 Minuten extrahiert, und der zur Trockne eingeengte Extrakt in 1 ml Methanol gelöst. Das Aufnehmen in Methanol brachte den Vorteil, daß dieses Gallensäuren nicht so gut löste wie Chloroform. Außerdem erwies es sich aus dem gleichen Grund als günstig, das Mischungsverhältnis des Steigmittels Chloroform : Methanol = 95:5 zu wählen. In 2 Fällen gelang erst dadurch eine Darstellung des Metopiron im Chromatogramm. Von den Extrakten wurde jeweils 0,1 ml aufgetragen. Die Chromatogramme konnten in der gewohnten Weise qualitativ und semiquantitativ ausgewertet werden.

E R G E B N I S S E

Qualitative Auswertung:

Im Dichloräthanextrakt aus Harn wurde eine Metopironausscheidung bis zu 10 Stunden nach der Applikation gefunden (siehe Abb. 3). Außerdem waren 4 Metaboliten auf Leuchtstoffplatten und mit Hilfe der Jodfärbung nachzuweisen. Bemerkenswert ist, daß der Metabolit IV auf Grund des Rf-Wertes und der Färbbarkeit einem Autoxidationsprodukt des Metopiron entsprach. Eine weitere Identifizierung dieser Substanzen durch Vergleich mit physiologisch im Harn auftretenden Steroiden im Dünnschichtchromatogramm oder mittels IR-Spektralanalyse ist bisher nicht gelungen. Mit Chloroform war es möglich, die Metaboliten I und III besser zu extrahieren. Es zeigte sich, daß der "Metabolit III" sehr schwach auch im Leerwert zu finden ist (siehe Abb. 4). Eine weitere Verbesserung der Extraktion mit anderen Lösungsmitteln wurde nicht erreicht (siehe auch Tab. 1). Der unter Lichtabschluß gewonnene Extrakt bewies, daß bei Extraktion unter Lichtzutritt keine quantitativen oder qualitativen Veränderungen der ausgeschiedenen Substanzen eintreten (siehe Abb. 5).

Eine Metopironausscheidung im Duodenalsaft wurde in Chloroform- und Ätherextrakten nachgewiesen. Der Rf-Wert für Metopiron für das geänderte Mischungsverhältnis des Steigmittels Chloroform : Methanol = 95:5 war 0,64. Das Auftreten von Metaboliten wurde nachgewiesen, jedoch war ihre Zahl und ihr chromatographisches Verhalten von Versuch zu Versuch verschieden. Selbst bei einem Wiederholungsversuch mit der gleichen Patientin war dies der Fall. Dies gilt für die Chloroform- wie für die Ätherextrakte (siehe Abb. 6 u. 7).

Quantitative Auswertung:

Für Harn und Galle wurden je 3 Versuche semiquantitativ ausgewertet. Die bei Extraktion mit Chloroform aus Harn gefundenen Durchschnittsergebnisse sind in Tabelle 2 und in den graphischen Darstellungen der Abbildungen 1 und 2 zusammengefaßt. Aus Galle wurden folgende Durchschnittswerte bestimmt:

	20 Min.	40 Min.	60 Min.	80 Min.
Gallenvolumen	18 ml	22 ml	12 ml	12 ml
Ausgeschiedene Metopironmenge	360 γ	1720 γ	500 γ	360 γ

Fermenthydrolyse von Harn und Galle nach Belastung mit Metopiron:

Da eine Ausscheidung von Metopiron bzw. der Metaboliten als Glucuronid oder Sulfat möglich war, wurde eine Fermenthydrolyse mit β-Glucuronidase-Arylsulfatase durchgeführt. Je 10 ml einer Harnleerwertportion, einer 0-4, 4-8 und 16-24 Stunden nach Belastung gesammelten Urinmenge wurden bei pH 4,5 (Na-Acetatpuffer) und bei pH 6,0 (Na-Citratpuffer) mit dem Ferment 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Von diesen Harnfraktionen wurden zum Vergleich zunächst auch je 10 ml mit Chloroform extrahiert und dann ebenso behandelt. In der gleichen Weise wurden Gallefraktionen (Leerwert, 0-1 und 1-2 Stunden nach Belastung gesammelte Mengen) aufgearbeitet.

Im Vergleich zu den ohne enzymatische Hydrolyse vor der Extraktion gewonnenen Ergebnissen fanden sich zwar keine qualitativen Veränderungen, jedoch konnte in den Harnproben bei pH 4,5 und insbesondere bei pH 6,0 eine Zunahme der Metopironfraktion bis auf das 25fache festgestellt werden. Gleichzeitig ergab sich nach der Hydrolyse bei pH 6,0 eine um das 30fache erhöhte Ausbeute des Metaboliten II und eine Verminderung des Metaboliten I in beiden Ansätzen auf weniger als die Hälfte. Während Metopiron in dem Sammelurin bis zu 8 Stunden nachweisbar blieb, konnte der Metabolit II im Harn auch nach 16 - 24 Stunden noch in größerer Menge gefunden werden. Versuche, die nach Vorextrahieren der Harne und anschließender Hydrolyse vorgenommen wurden, bestätigen diese Aussagen. Die Metaboliten I, "III", IV traten auch hier noch auf, obwohl ihre Extraktion durch den Fermentansatz negativ beeinflußt wurde (siehe Abb. 9 und 10, sowie Tab. 1). Die im Duodenalsaft nach Hydrolyse bei pH 6,0 gefundene Metopironmenge war auf das 2Cfache der zuvor festgestellten Werte gesteigert. Weitere Metaboliten traten nicht auf. Die in den vorextrahierten Gallen nachgewiesenen Mengen entsprachen diesem Ergebnis (siehe Abb. 8).

DC-Untersuchungen zur Frage der möglichen Identität des "Metaboliten III" mit Kortikoiden:

Um festzustellen, ob es sich bei den im Harn gefundenen Metaboliten um physiologisch auftretende Steroide handeln könnte, wurde eine dünnschichtchromatographische Methode zum gleichzeitigen Nachweis von Aldosteron, Desoxycorticosteronacetat, Hydrocortisonacetat, Corticosteron, Cortison, Hydrocortison und Tetrahydrocortison ausgearbeitet. Für diese Versuche wurde die Reinsubstanz dieser Kortikoide in Essigsäureäthylester gelöst. Die Färbung aller genannten Steroide gelang mit Phosphorsäure und Cer-IV-Sulfat.

Beide Farbreagenzien waren auch für den Nachweis durch Fluoreszenz unter UV-Licht (345 m) geeignet. Außer Tetrahydrocortison zeigten alle aufgeführten Kortikoide unter UV-Licht von 250 m Wellenlänge auf Leuchtstoffplatten eine deutliche Absorption. Unter 10 Steigmittelvarianten war die beste Trennung durch 2maliges Steigen in Chloroform-Methanol 9:1 zu erreichen. Folgende Rf-Werte wurden bestimmt:

Desoxycorticosteronacetat	0,88
Hydrocortisonacetat	0,8
Corticosteron	0,68
Cortison	0,63
Aldosteron	0,56
Hydrocortison	0,4
Tetrahydrocortison	0,23

(Siehe Abb. 11)

D I S K U S S I O N

Die i.v. Applikation von Metopiron führte zu einer relativ raschen Elimination dieser Substanz im Harn, wobei gleichzeitig bereits während der 1. Stunde 3 Metaboliten festgestellt werden konnten. Eine weitere dünnschichtchromatographisch abzutrennende Fraktion, "Metabolit III", die sich in niedriger Konzentration auch im Leerwert findet, wurde unter dem Einfluß des Metopiron vermehrt ausgeschieden. Ihr Eliminationsmaximum fand sich bereits innerhalb der 1. Stunde nach Metopironinjektion, so daß es sich bei der hervorgerufenen Mehrausscheidung um einen Früheffekt des 11ß-Hydroxylasehemmers handeln muß. Eine chromatographische oder färberische Verwandtschaft mit körpereigenen Steroiden konnte vorerst nicht nachgewiesen werden. Allerdings standen bis auf Corticosteron weitere 11-Desoxyderivate nicht zur Verfügung. Weitere Untersuchungen dieser körpereigenen Substanz sind im Gange.

Ein wesentlicher Teil des Metopiron dürfte im übrigen in Form von Metaboliten ausgeschieden werden. So überschritten bei einer Extraktion ohne fermentative Hydrolyse die Mengen an nicht konjugierten Metopironstoffwechselprodukten die eliminierte Menge an unverändertem Metopiron etwa um das 5-7fache, sofern man die Vergleichswerte auf die Metopiron-Reinsubstanz bezog. Eine Abhängigkeit der Ausscheidung des Metopiron und seiner Metaboliten von der Diurese fand sich hierbei nicht.

Die Pharmakodynamik von Metopiron, sowie der Metaboliten II und IV läßt eine weitgehende Übereinstimmung erkennen. Dagegen zeigte der Metabolit I gegenüber den anderen 2 Metopironderivaten insofern ein unterschiedliches Verhalten, als er

der einzige war, dessen Maximalwert erst während der 2. Stunde beobachtet werden konnte. Während Metopiron selbst und der Metabolit II nur bis zu 10 bzw. 24 Stunden im Harn gefunden wurden, werden die Metaboliten I und IV in relativ hohen Mengen noch bis zu 24 Stunden und darüber hinaus im Harn eliminiert. Sie stellen damit das Gros der Metopironstoffwechselprodukte. Die quantitativen Beziehungen zwischen Metopiron und seinen Metaboliten gelten allerdings nur für die "freien" Derivate. Die Fermenthydrolyse zeigte hingegen, daß der Metabolit II, weniger auch Metopiron selbst vorwiegend in gekoppelter Form zur Ausscheidung gelangt. Da die Ausbeute des Metaboliten II im pH-Optimum der Sulfatase am höchsten war, ist anzunehmen, daß diese Fraktion vorwiegend als Sulfat zur Ausscheidung gelangt. Dagegen ließen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen pH 4,5 und pH 6 für das Metopiron selbst feststellen, so daß letzteres möglicherweise als Glucuronid und Sulfat eliminiert werden kann.
In der Galle bzw. im Duodenalsaft ließ sich sicher nur Metopiron in unveränderter Form nachweisen, wobei auch hier die enzymatische Hydrolyse höhere Werte lieferte. Die Leberfunktion scheint auf diesen Eliminationsprozeß einen gewissen Einfluß zu haben, da bei Störungen der Cholerese die Metopironausscheidung im Duodenalsaft bzw. in der Galle reduziert war oder ganz fehlte.
Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse haben schließlich gezeigt, daß die intravenöse Applikation von Metopiron zu einer relativ raschen Metabolisierung und Ausscheidung dieser Substanz führt. Damit erklärt sich auch der relativ rasche Wirkungseintritt im Bereich des Kohlehydratstoffwechsels nach 30-60 Minuten (36, 37). Andererseits steht auch zu erwarten, daß die Rückwirkung des Metopiron auf die 11- -Hydroxylase und damit auf das Hypophysen-Nebennierenrinden-System, im Gegensatz zu einer oralen Applikationsweise sehr früh d.h. schon innerhalb der 1. Stunde nach der Injektion zu finden sein müßte.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Mit Hilfe semiquantitativer und präparativer dünnschichtchromatographischer Verfahren wurde Harn, bzw. Galle- und Duodenalsaft von insgesamt 13 Versuchspersonen nach i.v. Metopironbelastung auf ihren Gehalt an Metopiron und Metaboliten untersucht. Es fanden sich hierbei im Harn Metopiron selbst, sowie 3 neue Stoffwechselprodukte, die auf Grund ihrer unterschiedlichen Steigfähigkeit und ihres färberischen Verhaltens charakterisiert wurden. Eine weitere körpereigene Substanz ("Metabolit III") wurde vermehrt eliminiert. Das Eliminationsmaximum von Metopiron, sowie der Metaboliten I und IV fand sich innerhalb der 1. Stunde nach Metopironinjektion.

In der Galle bzw. im Duodenalsaft konnte nur die Metopironfraktion gefunden werden. Enzymatische Hydrolyse des Harns, sowie des Duodenalsaftes machten es wahrscheinlich, daß der Metabolit II vorwiegend in konjugierter Form als Sulfat und Metopiron selbst als Sulfat und/oder Glucuronid zur Ausscheidung gelangt. Die rasche Elimination des Metopiron nach i.v. Applikation läßt den Schluß zu, daß bei dieser Anwendungsform auch die Sekundäreffekte im Steroid- und Kohlehydratstoffwechsel bereits während der 1. Stunde auftreten müßten.

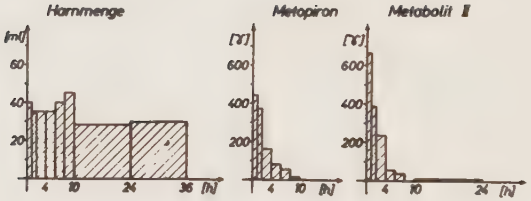


Abb. 1: Graphische Darstellungen der nach Metopironbelastung ausgeschiedenen Harnmenge, von Metopiron und des Metaboliten II.

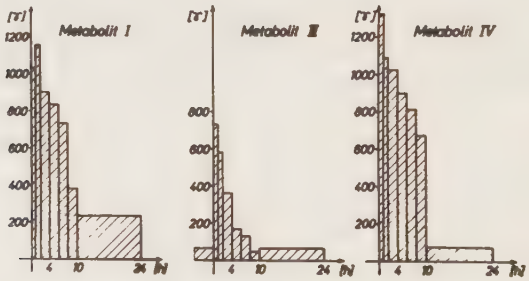


Abb. 2: Ausscheidungsdiagramme der Metaboliten I und IV sowie des "Metaboliten III".

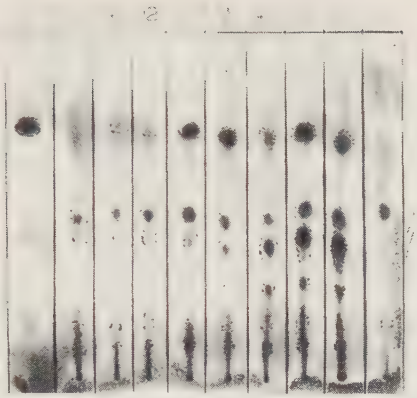


Abb. 3: Dünnschichtchromatogramm von Harnextrakten nach i.v. Metopironbelastung. Extraktionsmittel: Dichloräthan. Steigmittel: Chloroform:Methanol = 9:1. M = Metopiron-Reinsubstanz. LW = Harnleerwert.

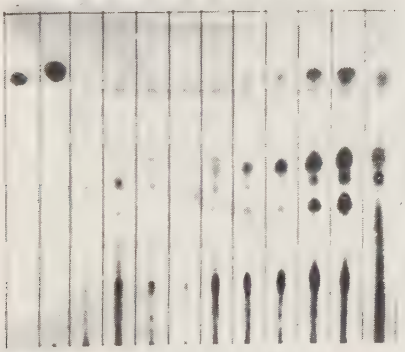


Abb. 4: Dünnschichtchromatogramm der gleichen Harnfraktionen wie in Abb. 3. Extraktionsmittel: Chloroform. Steigmittel: Chloroform:Methanol = 9:1 (2maliges Steigenlassen). M = Metopiron-Reinsubstanz. LW 2x = Doppelte Leerwertmenge.

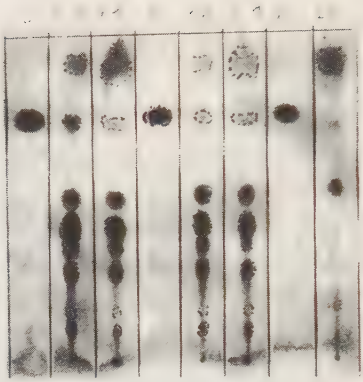


Abb. 5: Dünnschichtchromatogramm von 2 Dichloräthanextrakten der gleichen Harnprobe 1 Stunde nach Metopironbelastung. Bei a1 und a2 wurden 0,1 bzw. 0,2 ml des unter Lichtabschluß gewonnenen Extraktes, bei b1 und b2 die entsprechenden Mengen des bei Lichteinfall gewonnenen Extraktes aufgetragen. (Extraktmengen entsprechen 1 ml bzw. 2 ml Harn). LW = Leerwert. M = Metopiron.

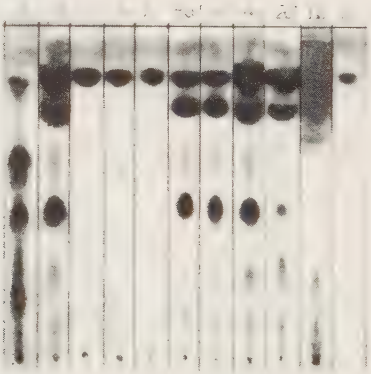
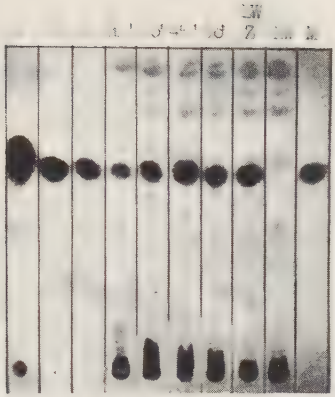
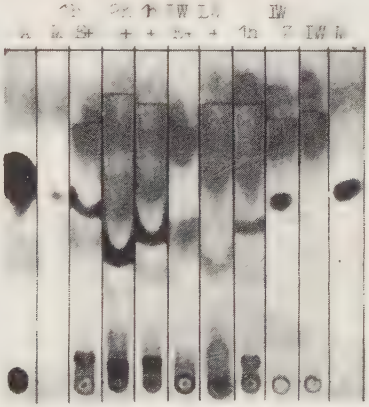


Abb. 6: Dünnschichtchromatogramm von Galleextrakten 2o bis 8o Min. nach i.v. Metopironapplikation. In der Spalte H wurde zum Vergleich neben der doppelten Extraktmenge der 4o Min.-Gallefraktion (G) o,1 ml eines Harnextraktes aufgetrennt. Extraktionsmittel: Chloroform. Steigmittel: Chloroform : Methanol = 9:1 (2maliges Steigenlassen). LW = Leerwert. M = verschiedene Mengen der Metopiron-Reinsubstanz.



Metopiron

Abb. 7: Dünnschichtchromatogramm von Gallefraktionen wie in Abb. 6. Extraktionsmittel: Diäthyläther. A = Metopiron direkt aus der spritzfertigen Ampulle aufgetragen. LWZ = Zusatz der gleichen Metopironcharge zum Galleleerwert nach Extraktion mit Diäthyläther. M = Verschiedene Metopiron-Reinsubstanzmengen. Steigmittel: Chloroform:Methanol = 95:5.



Metopiron

Abb. 8: Dünnschichtchromatogramm von Galleextrakten der Sammelfraktionen bis zu 2 Stunden nach i.v. Metopironbelastung. Die nach enzymatischen Hydrolyse gewonnenen Extrakte sind mit + bezeichnet, bei E+ wurde die Galle zusätzlich vorextrahiert. A = Metopiron aus der Ampulle. M = Metopiron-Reinsubstanz.

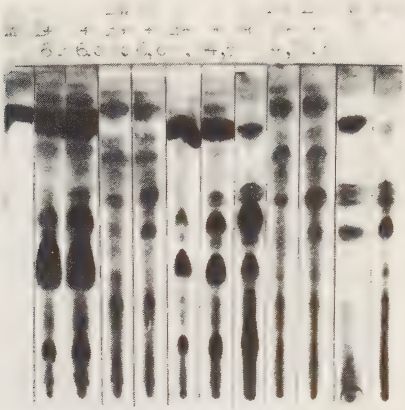


Abb. 9: Dünnschichtchromatogramm eines 4-Stundensammelurins. Mit + bezeichnete Extrakte wurden im angegebenen pH-Bereich mit β-Glucuronidase- Arylsulfatase hydrolysiert, mit E + bezeichnete wurden zusätzlich mit Chloroform vorextrahiert. LW-Z = Reinsubstanzzusatz zum Leerwert. LW = Leerwert. H = Probe ohne Fermenthydrolyse. M = Metopiron-Reinsubstanz.

Abb. 10: Dünnschichtchromatogramm der Harnextrakte der 0-4, 4-8, 16-24 Stundenfraktion nach Metopironbelastung. Fermenthydrolyse mit -Glucuronidase-Arylsulfatase bei mit + bezeichneten Chromatogrammen. M = Metopiron-Reinsubstanz.

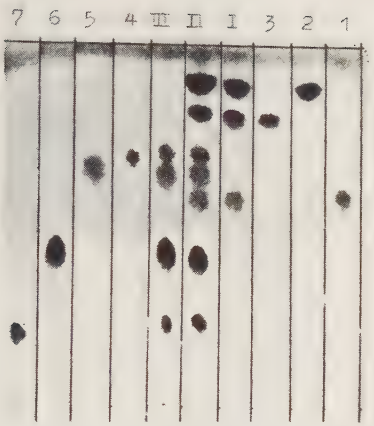


Abb. 11: Dünnschichtchromatogramm der genannten Steroide nach 2maligem Steigenlassen in Chloroform : Methanol = 9:1. Gefärbt wurde mit Cer-IV-Sulfat.

1. Aldosteron
2. Doca
3. Hydrocortisonacetat
4. Corticosteron
5. Cortison
6. Hydrocortison
7. Tetrahydrocortison

I. (1-3)
II. (1-7)
III. (4-7)

Tabelle 1: Chromatographische, färberische und pharmakodynamische Eigenschaften des Metopiron, seiner Metaboliten und von Fraktionen, die unter Metopironeinfluß eine sofortige quantitative Änderung erkennen lassen.

	Rf-Wert		Nachweis	Beste Löslichkeit in	Auftreten im Leerwert	Entspricht Autoxidationsprodukt	Gesamtausscheidung bez. auf Metopiron	β-Glucuronidase-Arylsulfatasehydrolyse, Vergleich mit Extraktion ohne Hydrolyse	
	1 x gestiegen	2 x gestiegen							
M I	0,2	0,3	J_2-Färbung und UV-Absorption	Chloroform	-	-	11,1 mg	ph 4,5	pH 6
								erheblich vermindert	deutlich vermindert
M II	0,3	0,51	J_2-Färbung und UV-Absorption	Dichloräthan und Chloroform	-	-	1,8 mg	gering vermehrt	30-fache Steigerung
"M III"	0,4	0,6	J_2-Färbung und UV-Absorption	Chloroform	+	-	3,6	unverändert	nicht feststellbar
M IV	0,5	0,6	J_2-Färbung und UV-Absorption	Dichloräthan und Chloroform	-	+	10,2 mg	vermindert	unverändert
Metopiron	0,76	0,82	J_2-Färbung und UV-Absorption	Dichloräthan und Chloroform	-	-	0,4 mg	20-fache Steigerung	25-fache Steigerung

Tabelle 2: Durchschnittswerte der semiquantitativen Bestimmung der Ausscheidung des Metopiron und der Metaboliten im Harn.

	1. St.	1.-2.St.	2.-4.St.	4.-6.St.	6.-8.St.	8.-10.St.	10.-24.St.	insgesamt
Harnmenge	40 ml	35 ml	70 ml	70 ml	80 ml	90 ml	300 ml	-
M I (γ/St.)	1032	1155	903	833	733	378	235	11,1 mg
M II (γ/St.)	660	385	231	518	29	-	8	1,8 mg
"M III" (γ/St.)	732	578	360	168	132	48	62	3,6 mg
M IV (γ/St.)	1320	1088	1025	898	808	671	70	10,2 mg
Metopiron (γ/St.)	110	106	48	24	13	3,6	-	0,4 mg

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. BENCE, W.L. und M.J. ALLEN:
   Chemistry and Structure-Activity Relationships of Amphenone Analogues.
   J. med. pharm. Chem. 1, 395 (1959)

2. BROWNIE, A.C. und J.G. SPRUNT:
   Metopirone in the Assessment of Pituitary-Adrenal Function.
   The Lancet i 1962, 773

3. CHART, J.J. und H. SHEPPARD:
   Pharmacology and biochemistry of some amphenone analogues and other adrenal cortical inhibitors.
   J. med. pharm. Chem. 1, 407 (1959)

4. CHART, J.J., H. SHEPPARD, T. MOWLES und N. HOWIE:
   Inhibitors of Corticosteroid 17α-Hydroxilation.
   Endocrinology 71, 479 (1962)

5. CLEVELAND, W.W., M. NIKEZIC und J.C. MIGEON:
   Response to an 11β-Hydroxylase Inhibitor (SU-4885) in Males with Adrenal Hyperplasia and their Parents.
   J. Clin. Endocrinol. & Metab. 22, 281 (1962)

6. DOMINGUEZ, O.V. und L.T. SAMUELS:
   Mechanism of inhibition of adrenal steroid 11 -hydroxylase by methopyrapone (metopirone).
   Endocrinology 73, 304 (1963)

7. FOSSEY, M.de, H. BRICLAIRE und L. de GENNES:
   Un nouveau test d'exploration hypophysaire: Le test a la Métopyrone ou SU 4885.
   La Presse Méd. 69, 1635 (1961)

8. FUNCK, F.-W. und L. ZICHA:
   Dünnschichtchromatographische Untersuchungen über den Stoffwechsel des Prednisolon und 6α-Methylprednisolon-Na-hemisuccinat.
   Med. exp. 7, 1 (1962)

9. GILETTE, J.R.:
Drug toxicity as a result of interference with physiological control mechanisms.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 123, 42 (1965)

10. GIROD, C. und J.C. CZYBA:
Influence of Dexamethasone and of Metopirone on the cytology of the islets of Langerhans' in the monkey, Macacua irus (F.Cuv.).
C. R. Soc. Biol. 158, 78 (1964)

11. HEINEN, G., H. BUCHHEIT und G.W. OERTEL:
Untersuchungen mit dem Adrenostatikum SU 4885 (Metopiron) in der Schwangerschaft.
Klin. Wschr. 41, 103 (1963)

12. HÖKFELT, B.:
Nya medel att påverka binjurebarkfunktionen.
Särtryck ur Nordisk Medicin 66, 1433 (1961)

13. JENKINS, J.S., J.W. MEAKIN und D.H. NELSON:
A comparison of the inhibitory effects of 2-methyl-1, 2-bis (3-pyridyl)-1-propanone and amphenone B on adrenal cortical secretion in the dog.
Endocrinology 64, 572 (1959)

14. JENNY, M., A.M. RIONDEL und A.F. MULLER:
Applications diagnostiques et thérapeutiques d'un nouvel adrénostatique, le SU 4885 (Métopirone).
Suisse Méd. 92, 311 (1962)

15. KAHNT, F.W. und R. NEHER:
On the Specific Inhibition of Adrenal Steroid Biosynthesis.
Exper. 18, 499 (1962)

16. KALIOMÄKI, J.L., N.T. SAARIMAA und E. TALA:
Pituitary Corticotrophin (ACTH) production in Rheumatoid Arthritis tested indirectly with Metopiron (SU 4885).
Ann. Rheum. Dis. 20, 244 (1961)

17. KLEIN, R., P.M. TAYLOR, P. HAYS und U. MASQUELIER:
Response of Female Premature Infants to SU 4885.
Pediatrics 61, 79 (1962)

18. KLEINFELDER, H., H. BRACHARZ und E. GEBERT:
Die Bestimmung der hypophysären ACTH-Reserve mit SU 4885 (Metopiron).
Klin. Wschr. 39, 1153 (1961)

19. LAMBERG, B.A., T. PETTERSSON und R. KARLSSON:
Die Wirkung von Angiotensin und Metopiron auf den Gehalt an Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Succinatdehydrogenase in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde intakter Ratten.
Klin. Wschr. 43, 573 (1965)

20. LEVY, H., C.H. CHA und J.J. CARLO:
The selective inhibition by metopirone of 11β-hydroxylation in bovine adrenal perfusion of 17-hydroxyprogesterone (1).
Steroids 5, 337 (1965)

21. LEVY, H., C.H. CHA und J.J. CARLO:
The inhibition by Metopirone of 11β-and 19-hydroxylations of androst-4ene-3, 17-dione in bovine adrenal perfusion (1)
Steroids 5, 479 (1965)

22. LEVY, H., C.H. CHA und J.J. CARLO:
The inhibition by Metopirone of 11β- and 19-hydroxylations of 11-deoxycortisol in bovine adrenal perfusion.
Steroids 5, 469 (1965)

23. MARTINIS, C. de und F. PUPITA:
Un nuovo inibitore della sintesi degli ormoni cortocosurrenalici: il 2-metil-1, 2-bis (3piridil)-1-propanone (SU 4885-Metopirone).
Min. Med. 53, 1367 (1962)

24. MIROUZE, J., P. CHRISTOL, C. JAFFIOL, M. BADACH und A. SATINGHER:
La Stéroidogénèse au cours du test à la Métopyrone.
Sèm. Hôp. 39, 415 (1963)

25. NORMAN, N.:
The urinary excretion of 3α, 17α, 21-Trihydroxy-5β-Pregnan-20-One (Tetrahydro S) following administration of Corticotrophin and Metopirone (CIBA SU 4885).
Acta endocr. 40, 375 (1962)

26. PAPACOSTAS, C.A.:
Circulatory performance under surgical stress during adrenocortical suppression.
Am. J. Physiol. 200, 975 (1961)

27. PERRAULT, M. und J. MODAI:
Sur les Inhibiteurs de la Fonction Cortico-Surrénale en Thérapeutique.
Revue de Practicien 33, 3449 (1961)

28. PFEIFFER, E.F.:
Diskussion zum Vortrag Zicha und Mitarbeiter:
Untersuchungen über Stoffwechseleffekte und die Wirkungsdauer von Metopiron.
10. Symp. Dtsch. Ges. Endokronologie, Wien 1963

29. PICENI - SERENI, L., L. de RITIS und F. SERENI:
L'impiego di un inibitore della 11-β-idrossilasi surrenalica (Metopirone) nella diagnosi differenziale nanismo.
Min. Ped. 13, 1723 (1961)

30. SAVAGE, O., W.S.C. COPEMAN, L. CHAPMAN, M.V. WELLS und B.L.J. TREADWELL:
Pituitary and Adrenal Hormones in Rheumatoid Arthritis.
The Lancet i 1962, 232

31. SCHEIFFARTH, F., L. ZICHA, F.-W. FUNCK und M. ENGELHARDT:
Dünnschichtchromatographische Untersuchungen über die Auftrennung von Steroidgemischen und die Ausscheidung intravenös applizierter Glucocorticoidester in Galle und Duodenalsaft.
Acta endocr. 43, 227 (1963)

32. SILVESTRINI, F., G. FAGLIA, R. d'ALSCNO, D. GELLI und E. CASTEGNARO:
Il 5 -Pregnan-3 , 17 , 20 - triolo nelle urine di sogetti sottoposti a somministrazione di metopirone.
Folia Endocrinologica 15, 291 (1962)

33. SOLEM, J.J. und T. BRINCK-JOHNSEN:
Indirect estimation of Pituitary Corticotropin reserve in man by use of an Adrenocortical 11β-hydroxylase inhibitor (SU 4885 CIBA).
Acta Medica Scandinavica 170, 89 (1961)

34. STAHL, E.:
Dünnschichtchromatographie.
Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg (1962)

35. STEENBURG, R.W. und B.H. THOMASSON:
Dose response characteristics of methopirapone: studies in dogs utilizing a fluorescence procedure for estimating adrenal output of 11-hydroxycorticosteroids.
Metabolism 14, 253 (1965)

36. ZICHA, L., D. BERGNER und A. CHRISTMANN:
Untersuchungen über den Einfluß von Metopiron auf die Glucosetoleranz mit und ohne zusätzliche Applikation von ACTH und Prednisolon.
Glucokortikoide und Glucosestoffwechsel Mitteilung 2

37. ZICHA, L., F. SCHEIFFAHRT, D. BERGNER, A. CHRISTMANN und G. POSER:
Untersuchungen über Stoffwechseleffekte und die Wirkungsdauer von Metopiron.
Vortr. 10. Symp. Dtsch. Ges. Endokrinologie, Wien 1963

38. ZICHA, L., F. FREYTAG und F. WEIST:
Dünnschichtchromatographische Untersuchungen über die orale und rectale Resorption von 3-Methyl-3, 4-dihydroxy-4-phenyl-butin 1 und seine Ausscheidung in Galle, Harn und Liquor.
Arzneim. Forsch. 14, 777 (1965)

39. ZICHA, L., F. WEIST, F. SCHEIFFAHRT und E. SCHMID:
Dünnschichtchromatographische Untersuchungen des 3'(3-Oxo-7α-acethylthio-17β-hydroxy-4-androsten-17α-yl)-propion--lactons und seiner Metaboliten beim Menschen.
Arzneim.-Forsch. 14, 699 (1964)

Es ist mir eine angenehme Pflicht,
Herrn Prof. Dr. med. N. Henning für
die Übernahme des Referates zu danken.

Ferner schulde ich Dank
Herrn Dr. med. L. Zicha
für die freundliche Überlassung des
Themas, sowie für die vorzügliche
Unterstützung in Rat und Tat.

L E B E N S L A U F

Als Sohn des Krankenpflegers Johann Wink und seiner Ehefrau Berta, geb. Bössennecker, wurde ich am 21. September 1938 in Neusatz (Jugoslawien) geboren. Nach der Vertreibung besuchte ich von 1944 bis 1950 die Volksschule in Marktlustenau, Kreis Crailsheim. Im Herbst 1950 trat ich in das Albert-Schweitzer-Gymnasium in Crailsheim ein, wo ich im März 1959 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1960 schrieb ich mich, nachdem ich zuvor meinen Wehrdienst abgeleistet hatte, an der Universität Erlangen für das Medizinstudium ein. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich im Herbst 1961, die ärztliche Vorprüfung im Frühjahr 1963. Das klinische Studium begann ich ebenfalls in Erlangen, setzte es im 7. und 8. Semester in Wien fort und beabsichtige es nach dem Wintersemester 1965/66 mit dem Staatsexamen in Erlangen abzuschließen.

Staatsexamen am 6. 10. 1966 beendet.

Offsetdruck - Fotodruck
Josef Hogl
8520 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz,) Tel. 22990

Offsetdruck - Fotodruck
- J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Telefon 22990 -